
Eliminación de fenol, 2-clorofenol y colorantes en aguas artificialmente contaminadas y aguas residuales textiles utilizando a la peroxidasa de chayote.

A. I. A. Alonso-Calderón¹, J. Pérez-Curiel², C. Montiel-Salinas², G. Geissler¹, M. T. Zayas-Pérez¹ y M. L. O. Villegas-Rosas^{1*}.

¹ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias, Posgrado en Ciencias Ambientales, C.U. Jardines de San Manuel. C. P.:72570, Puebla, Pue. México y ² Universidad Politécnica de Puebla. Tel. (222) 229 55 00 ext. 7291. Fax: (222) 2 29 55 51.

Phenol, 2-chlorophenol elimination and coloring in artificially contaminated waters and textile waste waters using peroxidase of chayote.

Abstract

Peroxidases are a class of enzymes that catalyze the oxidation of a wide variety of aromatic pollutants. However, *Horseradish* (*Armoracia rusticana* L.), the most used source of peroxidases, does not grow well in México. In our laboratory we are currently investigating the Chayote (*Sechium edule* Sw) as an alternative new source, since it is locally available and could be able to substitute *Horseradish* peroxidase. The adequate quantities of chayote peroxidase and hydrogen peroxide used for the removal of phenol, 2-chlorophenol, and the direct black and black-22 dyes from wastewater catalyzed by chayote peroxidase were studied. The results indicated that phenol and 2-chlorophenol were quickly removed from a formulated wastewater. Chayote peroxidase was able to remove 88.53% of phenol and 95.6% of 2-chlorophenol. Wastewater treatment of a textile industry effluent, containing direct black and black-22 dyes, were removed more than 90 and 80% respectively. Thus, peroxidase from chayote has a great potential for decontamination of wastewaters containing phenolic compounds and dyes of the azo kind.

Keywords: peroxidase, chayote, pollution, dyes wastewater

Resumen

Las peroxidasas son una clase de enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de contaminantes aromáticos. Sin embargo, la peroxidasa de *Horseradish* (*Armoracia rusticana* L.), la fuente más utilizada de éstas enzimas para este propósito no crece bien en México, por lo que en nuestro laboratorio se está estudiando al Chayote (*Sechium edule* Sw) como una fuente vegetal alternativa disponible localmente para la obtención de peroxidasas y poder así sustituir a las obtenidas de *Horseradish*. En este trabajo se presentan los estudios para la determinación de las cantidades de peroxidasa de chayote y peróxido de hidrógeno en la remoción de fenol, 2-clorofenol, y los colorantes negro directo y negro-22 de aguas residuales (catalizadas por la peroxidasa de chayote). Los resultados indicaron que el fenol y 2-clorofenol son rápidamente removidos de aguas artificialmente contaminadas, lográndose valores de remoción del 88.5 y 95.9%, respectivamente. Por otro lado, el tratamiento de aguas residuales provenientes de una empresa textil, conteniendo a los colorantes negro directo y negro-22, mostró que éstos fueron removidos en más del 90 y 80%, respectivamente. Así, la peroxidasa de chayote presenta un gran potencial para la descontaminación de aguas residuales conteniendo compuestos fenólicos y colorantes del tipo azo-sulfonados, como los aquí mencionados.

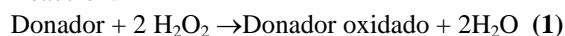
Palabras clave: peroxidasa, chayote, contaminación, aguas residuales

* Autor de correspondencia
E-mail: osneldavillegas@yahoo.com.mx

Introducción

Las peroxidasas son enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción de sustancias orgánicas e inorgánicas utilizando peróxido de hidrógeno. La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímicos las ha clasificado dentro de la subclase de las Óxido-Reductasas como E.C. 1.11.1.7: Donador H₂O₂

Reacción:



Especificidad: Una gran variedad de sustancias pueden actuar como donadores.

(Internacional Union of Biochemistry, 1984).

Un parámetro importante que caracteriza a las peroxidasas es el número de pureza o también conocido en la literatura como *Reinheitzahl* (RZ), el cual establece la relación de absorbancia entre la longitud de onda de Soret (cercana a 400 nm) y el contenido de aminoácidos (280 nm) y que es considerado como un criterio de pureza para éstas (Shannon et al., 1966). Sin embargo, el RZ no es una medida directa de la actividad enzimática, ya que es posible en principio encontrar preparaciones con valores de RZ altos y baja actividad.

La actividad enzimática es determinada usualmente mediante la formación de un producto coloreado. Han sido usados muchos sustratos reductores como *o*-dianisina, *o*-fenilendiamina y mesidina, pero debido a que las aminas aromáticas y sus productos de oxidación son cancerígenos, se ha preferido usar algún sustituto como el guayacol (Pütter, 1974).

Las peroxidasas han sido utilizadas para el tratamiento de compuestos aromáticos contaminantes en aguas provenientes de diferentes fuentes, pero principalmente la peroxidasa de *Horseradish* (HRP) se ha usado para la remoción de contaminantes fenólicos, así como también ha sido capaz de remover anilinas aromáticas, hidroxiquinoleína y carcinogénicos como benzidinas y naftilaminas (Wagner and Nicell, 2002) pero al ser una enzima de importación su costo es alto. A partir de la década de los 80's se propuso el uso de hongos de la pudrición blanca como alternativa para realizar la decoloración de efluentes (Rodríguez y Vázquez, 1999), estos organismos poseen un sistema enzimático extracelular de carácter no específico, capaz de romper una gran cantidad de enlaces y por lo tanto degradar diferentes compuestos orgánicos. Dentro

de las enzimas constituyentes del complejo multienzimático de estos hongos se encuentra la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa que han demostrado ser eficientes en el tratamiento de efluentes industriales coloreados (Rodríguez et al., 2003). Mediante la peroxidasa de chayote (fruto utilizado básicamente para alimentación), ha sido posible eliminar fenol y algunos de sus derivados de aguas artificialmente contaminadas a bajas concentraciones (Villegas-Rosas et al., 2003) y esto nos motiva para utilizarla en la eliminación de compuestos más complejos como son los colorantes textiles, los cuales pueden ser potencialmente peligrosos por su alto grado de toxicidad cuando son degradados en el ambiente.

Material y Métodos

Se partió de 1.2 kg de fruto de chayote y se obtuvo el zumo, el cual fue centrifugado a 7000 rpm durante 30 min. a 4 °C (centrifuga refrigerada, Sorvall R5C). El sobrenadante fue sometido a un proceso de diálisis durante 15 h en amortiguador de acetato de sodio-ácido acético 10 mM, a un pH de 4.5 y a una temperatura de 4 °C. Una vez concluido el tiempo, el dializado fue centrifugado a 7000 rpm durante 30 min a 4 °C, el sólido obtenido fue separando del sobrenadante y a éste se le realizó una cromatografía de intercambio catiónico utilizando una columna cromatográfica de 2.5x20 cm la cual fue empaquetada con el intercambiador carboximetilcelulosa (CM-52, Whatman) previamente equilibrada a un pH de 4.5 y con un volumen de cama de 80 ml. Las proteínas retenidas fueron eluidas con 100 ml del amortiguador de acetato de sodio-ácido acético 1M, a un pH de 4.5 y se obtuvo un volumen de 60 ml del concentrado de proteínas de chayote (CPCh). A éste se le realizó su espectro de absorción en el intervalo de longitudes de onda de 230 a 800 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz, a una velocidad rápida, con un slit de 2.0 y mediante el software

Tabla 1. Porcentajes de remoción de fenol y 2-clorofenol de aguas artificialmente contaminadas (1000 ppm) y de sus polímeros correspondientes, determinados mediante espectroscopía UV/Vis.

Alonso-Calderón et al. / Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, 4 (2):278-284, 2008

Fenol		% de remoción	Polímeros de fenol		% de remoción
A ₁ (270 nm)	A ₂ (270nm)		A ₁ (400nm)	A ₂ (400nm)	
2.53	0.29	88.5	1.42	0.011	99.1

2-clorofenol		% de remoción	Polímeros de 2-clorofenol		% de remoción
A ₁ (270nm)	A ₂ (270nm)		A ₁ (436nm)	A ₂ (436nm)	
2.65	0.1073	95.9	0.853	0.003	99.5

*Los valores de absorbancia presentados son el resultado promedio de los experimentos realizados por triplicado.

Agilent 8453 (espectrofotómetro de absorción Agilent 8453 UV-visible). A partir de éste se determinó la longitud de onda de la banda de Soret y se calculó su RZ (A_{403nm}/A_{280nm}). La actividad enzimática fue determinada siguiendo el método reportado por Pütter J. (Pütter, 1974). Se prepararon 10 ml de soluciones conteniendo 1000 ppm de fenol y 2-clorofenol (las cuales fueron consideradas como aguas artificialmente contaminadas), y se les adicionaron 3 ml del CPCh y para iniciar la reacción se añadieron 2 ml de H₂O₂ (12.3 mM). Para el seguimiento de la transformación del fenol y del 2-clorofenol en sus polímeros correspondientes, se tomó un alícuota de la mezcla de reacción cada 60 s y le realizó su espectro de absorción UV/Vis (250 a 800 nm), hasta que ya no se observó cambio en la absorción, forma o posición de las bandas espectroscópicas. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó en reposo 24 h y fue filtrada con papel Whatman No 1. Por lo que respecta a las aguas residuales, éstas fueron proporcionadas por una empresa textil de Santa Ana Xalmimilulco, Puebla.

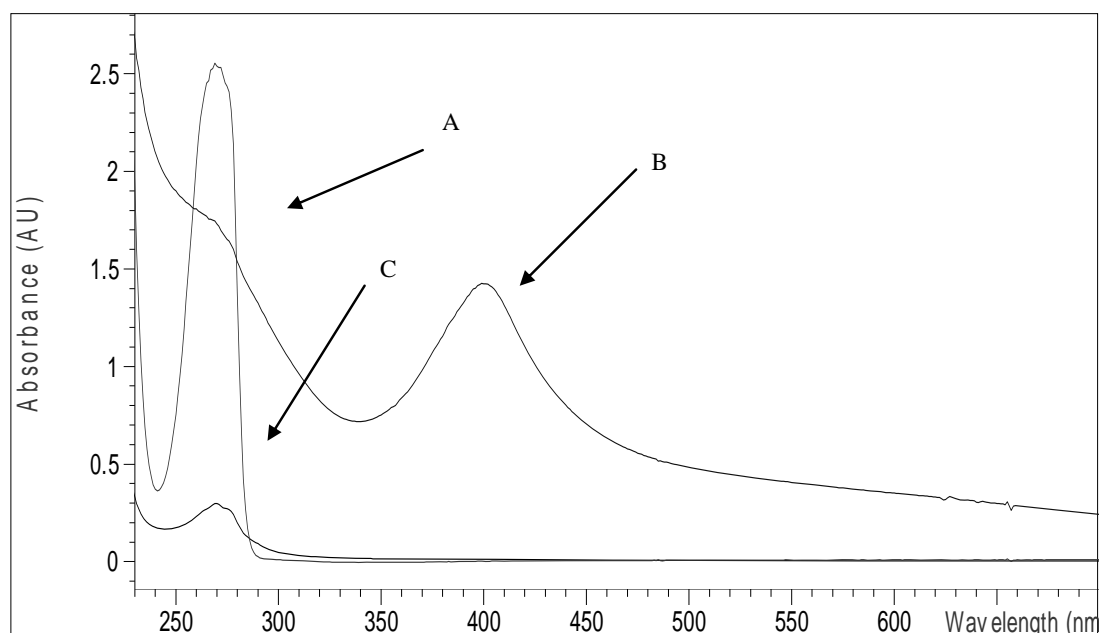
Las muestras de aguas con los colorantes negro directo y negro 22 fueron obtenidas de la etapa del teñido de pantalones de mezclilla directamente de una de las lavadoras. Posteriormente, fueron filtradas (papel Whatman No 1) y se les realizaron sus espectros de absorción UV/Vis (350 a 800 nm). Para el tratamiento de estas aguas se utilizaron alícuotas de 15 ml a las que se les adicionaron 0.5 ml del CPCh y 0.5 ml de H₂O₂ (24.6 mM) y la reacción se dejó transcurrir durante 60 minutos con agitación constante. Para el monitoreo de la misma se tomaron alícuotas de 3 ml las cuales fueron filtradas con papel Whatman No. 1 y se obtuvo su

espectro de absorción. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Para la determinación del porcentaje de decoloración se consideró la longitud de onda característica del colorante y se determinó la absorbancia antes y después del tratamiento enzimático de las aguas residuales.

Resultados y discusión

El concentrado de proteínas de chayote presentó un número de pureza de 0.16 y una actividad enzimática de 10 886 unidades por litro (U/L).



- Espectro A** Agua sin tratar 1:4.
Espectro B Agua con la máxima formación de polímeros 1:15.
Espectro C Agua después de haber sido tratada y filtrada.

Figura 1. Espectro de absorción UV/Vis del agua artificialmente contaminada conteniendo 1000 ppm de fenol antes y después de su tratamiento.

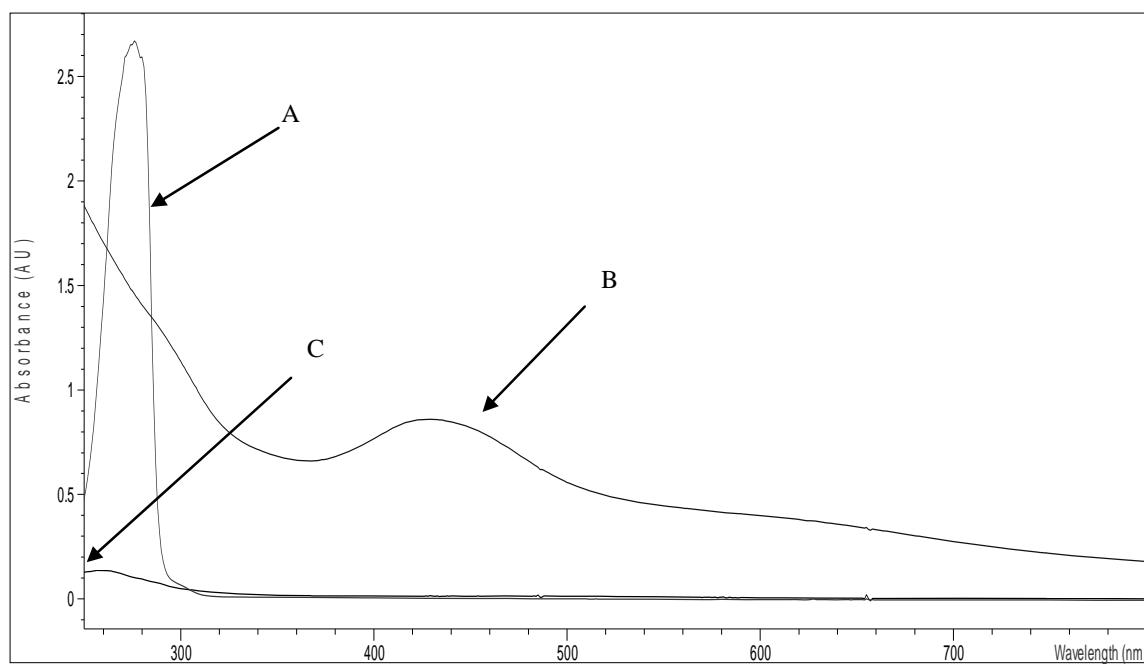
El tratamiento de las aguas artificialmente contaminadas con el CPCh logró remover el 88.5% para fenol y 95.9% para 2-clorofenol. Por lo que respecta a los polímeros formados fueron removidos el 99.1 y 99.5% para fenol y 2-clorofenol, respectivamente (Tabla 1 y Fig. 1 y 2).

Con respecto a las aguas residuales textiles se tuvieron decoloraciones del 93.2% para el negro directo y 84.3 % para el negro 22. (Tabla 2 y Fig. 3 y 4).

Tabla 2. Porcentajes de decoloración de las aguas residuales textiles determinado mediante espectroscopía UV/Vis.

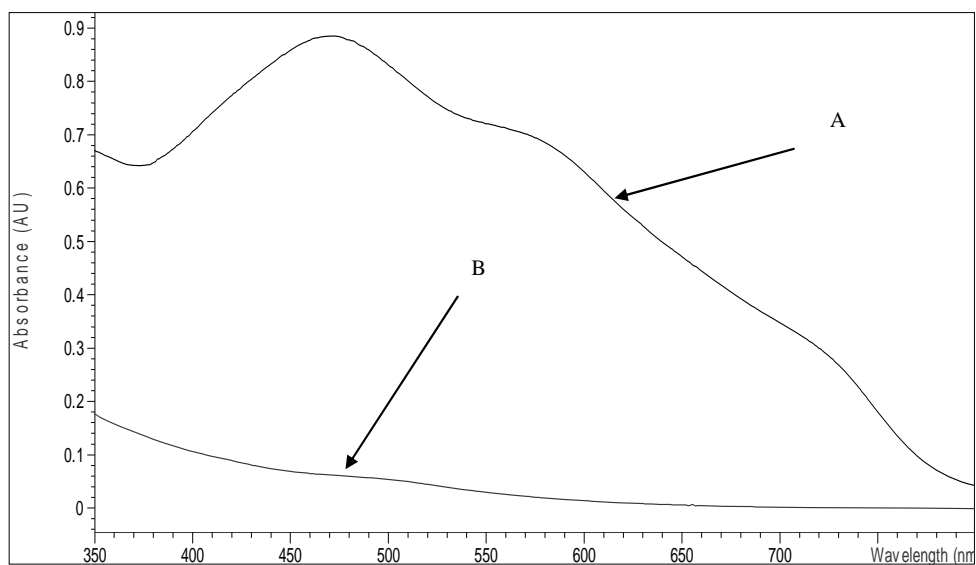
Colorante	A ₁ (470nm)	A ₂ (470 nm)	% de decoloración
Negro directo	0.8794	0.0590	93.20
Negro 22	1.1921	0.1871	84.30

*Los valores de absorbancia presentados son el resultado promedio de los experimentos realizados por triplicado.



- Espectro A Agua sin tratar (diluida de 1:4).
- Espectro B Agua con la máxima formación de polímeros (diluida de 1:15).
- Espectro C Agua después de haber sido tratada y filtrada.

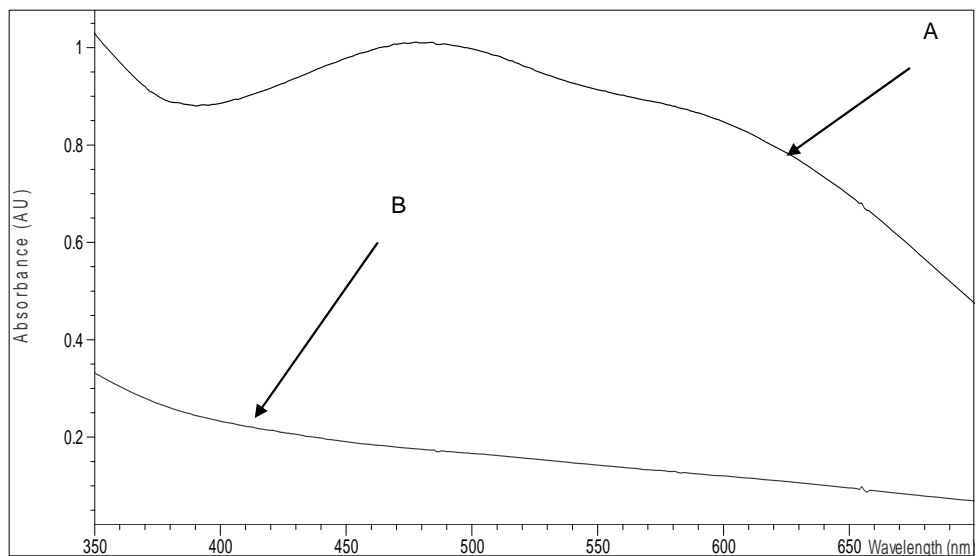
Figura 2. Espectro de absorción UV/Vis del agua artificialmente contaminada conteniendo 1000 ppm de 2-clorofenol antes y después de su tratamiento.



Espectro Agua sin tratar (diluida de 1:6).

Espectro Agua tratada (diluida de 1:6).

Figura 3. Espectros de absorción UV/Vis del agua residual con el colorante negro directo.



Espectro A Agua sin tratar (diluida de 1:6).

Espectro B Agua tratada (diluida de 1:6).

Figura 4. Espectros de absorción UV/Vis del agua residual con el colorante negro 22.

La utilización del concentrado de proteínas de chayote con RZ de 0.16 mostró buenos porcentajes de remoción de los contaminantes estudiados (fenol y 2-clorofenol), debido a que se encuentran presentes las diferentes isoenzimas de la peroxidasa de chayote, ya que en estudios previos se ha logrado la purificación parcial mediante métodos cromatográficos de tres fracciones con actividad peroxidasa diferente y RZ de hasta 1.3 (Villegas-Rosas et al., 2003). Además, de utilizar a la peroxidasa de chayote con número de pureza menor que el reportado por otros autores en la literatura para la de *Horseradish* (Arseguel and Michael, 1994; Wagner and Nicell, 2002) y disminuir el costo y tiempo en la purificación de las peroxidases del chayote.

Es importante mencionar que se lograron tratar aguas artificialmente contaminadas con fenol y 2-clorofenol a concentraciones letales para los microorganismos degradadores de estos compuestos en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Con respecto a las aguas residuales textiles, en la literatura se reporta la remoción del 90 al 95% del colorante tipo azo Orange II mediante la manganoperoxidasa (Feijoo et al., 2003), valores similares a los obtenidos con la peroxidasa de chayote aplicada a la remoción de los colorantes textiles aquí estudiados que también son de naturaleza poliazó.

Conclusiones

Se logró utilizar una peroxidasa con un índice de pureza relativamente bajo en la remoción de compuestos fenólicos y colorantes textiles.

Se logró remover al fenol y sus polímeros obtenidos en un 88.5 y 99.1% respectivamente.

Para el 2-clorofenol se logró una remoción del 95.9% y para sus polímeros del 99.5%.

De los resultados obtenidos podemos concluir que la peroxidasa de chayote presenta gran capacidad para la descontaminación de aguas residuales conteniendo compuestos fenólicos y colorantes del tipo poliazó, como los aquí mencionados.

Bibliografía

- Arseguel, D., Baboulene, M. 1994. Renoval of phenol from coupling of talc and peroxidase. Application for depollution of waste water containing phenolic compounds. *J. Chem. Biotechnol.*, 61, 331-335.
- Feijoo, C. G., Lema, R. J. M., Moreira, V. M. T. 2003. Procedimiento de degradación de compuestos orgánicos presentes en efluentes industriales mediante reactores enzimáticos y su aplicación en la decoloración de tintes industriales, Universidad de Santiago de Compostela. Solicitud de patente.
- International Union of Biochemistry. 1984. Enzyme nomenclature. Academic Press. Orlando. EUA.
- Pütter, J. 1974. *Peroxidases. In Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmeyer Ed. Academic Press, New. Vol. 2. Second Edition pp. 301-315.
- Rodríguez, E., Pickard, M., Vazquez-Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*, 38, 27-31.
- Rodríguez, F. M., Bermúdez, R. y Morris, H. 2003. Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp.* *Rev. Iberoam. Micol.* 20, 164-168.
- Shannon, L. M., Kay, E., Lew, J. Y. 1966. Peroxidase isoenzymes from Horseradish roots. I. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.*, 241, 2166-2172.
- Villegas-Rosas, M. L. O., Geissler, G., Handal-Silva, A. y González-Vergara, E. 2003. Inmovilización de una peroxidasa de chayote (*Sechium edule* (Jacq) Sw.) y su potencial aplicación en la remoción de sustancias fenólicas en aguas contaminadas. *REVista INTERNACIONAL de Contaminación AMBIENTAL*, No. 19 (2). 73-81.
- Villegas-Rosas, M. L. O. 2003. Utilización de la peroxidasa de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw) en el tratamiento de aguas contaminadas con sustancias orgánicas tóxicas. Tesis de Doctoral, Posgrado en Ciencias Ambientales. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue., México.
- Wagner, M. and Nicell, J. A. 2002. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research*, 36,4041-4052.